Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Virologie der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. P. Naumann

KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON ANTIBIOTIKA IN DER EXTRAVASALEN FLÜSSIGKEIT DES MENSCHLICHEN KNOCHENS UNTERSUCHUNGEN MIT CEFOTAXIM

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wolfgang Uphaus

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0146

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Virologie der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. P. Naumann

Konzentrationsbestimmung von Antibiotika in der extravasalen Flüssigkeit des menschlichen Knochens. Untersuchungen mit Cefotaxim.

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Wolfgang Uphaus
1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Straßburg

Referent
gez.: Prof. Dr. Rosin

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Krömer

Danksagung

Herrn Prof. Dr. P. Naumann, Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universität Düsseldorf, möchte ich an dieser Stelle meinen Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine Unterstützung ausdrücken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Rosin für die Überlassung des Themas und seine Betreuung der Arbeit.

Herrn Dr.med. J. Vent, Orthopädische Universitätsklinik Düsseldorf, Direktor Prof. Dr. K.-P. Schulitz, danke ich für die Entnahme und Überlassung der Untersuchungsproben.

Für die technische Hilfe möchte ich der med.-techn. Assistentin Frau R. Löken danken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Geschichte und Literatur	
2.1 Zur Anatomie der Gefäße des Knochens und des Knochenmarks	2
2.2 Zur Pathohistologie von bakteriellen Knocheninfektionen	3
2.3 Zur Entwicklung von Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von Antibiotika im Knochen	5
3. Material und Methode	
3.1 Probengewinnung	8
3.2 Präparation und Elution	8
3.3 Hämoglobin- und Immunglobulin M - Bestimmung	10
3.4 Agardiffusionstest	10
4. Ergebnisse	14
5. Diskussion	
5.1 Zur einfachen Homogenisation	24
5.2 Zur Ermittlung des Blutanteils durch die Hämoglobinkonzentrationsbestimmung	29
5.3 Zur Ermittlung des Serumanteils durch die Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen der Klasse M	29
5.4 Zur Wirkstoffkonzentration im Vollblut und im Serum	30
5.5 Diskussion der Ergebnisse	32
6. Zusammenfassung	34
7. Literaturverzeichnis	35
Lebenslauf	

1. Einleitung

Der Schwerpunkt der Osteomyelitistherapie hat sich im Laufe der letzten Jahre von der akuten hämatogenen Osteomyelitis zur chronischen posttraumatischen Osteomyelitis verlagert. Die chronische posttraumatische Osteomyelitis hat durch die steigende Zahl von Unfällen mit offenen Frakturen und die steigende Zahl von Knochenoperationen quantitativ zugenommen (1). Hospitalismuskeime sind häufige Erreger der chronischen posttraumatischen Osteomyelitis, und die Therapie dieser Infektionen gestaltet sich immer schwieriger. Es entwickelte sich eine lebhafte Diskussion über Sinn und Effektivität der Chemoprophylaxe in der Traumatologie (2) und der Chemotherapie von Osteomyelitiden. Experimentelle Untersuchungen über die erreichbaren Antibiotikakonzentrationen im Knochen sollten die klinischen Argumente unterstützen.

In der Regel wurden von den Untersuchern recht hohe Antibiotikakonzentrationen gefunden und daraus optimistische Erwartungen für die Chemotherapie hergeleitet. Demgegenüber stehen aber die enttäuschenden klinischen Ergebnisse der Chemotherapie, vor allen Dingen bei der chronischen posttraumatischen Osteomyelitis.

Diese Studie hat zwei Ziele: erstens sollen die bisher angewandten Untersuchungsmethoden kritisch analysiert werden, zweitens soll eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen der positiven Erwartung und dem häufigen Versagen der Chemotherapie bei bakteriellen Knocheninfektionen gefunden werden.

2. Geschichte und Literatur

2.1 Zur Anatomie der Gefäße des Knochens und des Knochenmarks

Die Kompakta des Knochens unterscheidet sich von den im Markraum liegenden Knochenspangen der Spongiosa in Anordnung und Aufbau der sie versorgenden Gefäße. Während die Kompakta eigene Gefäße besitzt, die in den Havers'schen und Volkmann'schen Kanälen verlaufen, sind die Knochenbälkchen der Spongiosa gefäßlos. Ihre Versorgung wird von den Gefäßen des Knochenmarks per diffusionem gewährleistet. Teilweise verlaufen die Marksinus auch den Knochenbälkchen der Spongiosa anliegend und zwar so, daß die Endostzellen partiell die Funktion der Endothelzellen übernehmen (3).
Die Gefäßwände der Markarterien weisen eine kontinuierliche Basalmembran auf, während die Marksinus ein Endothel aus primitiven retikulären Zellen ohne Basalmembran besitzen (4). Die Marksinus sind dem Kapillartyp III der Klassifizierung von MAJNO (5) zuzuordnen. Das heißt, sie gehören zu den diskontinuierlichen Kapillaren mit Endothellücken sowie diskontinuierlicher bzw. fehlender Basalmembran.
Bei der Diapedese von Zellen aus dem Knochenmark in das Sinuslumen treten die Endothelzellen, die ihrer Herkunft nach primitive Retikulumzellen sind, auseinander, und es entstehen interzelluläre Lücken, durch welche sich die Markzellen hindurchzwängen. Dabei scheint die Geschlossenheit der Sinusbegrenzung partiell verlorenzugehen. Wie ZAMBONI und PEASE (6) anhand von elektronenoptischen Untersuchungen am Meerschweinchen zeigen konnten, sind die zwischen den Retikulumzellen und Markzellen entstehenden Zwischenräume ca. 1 µm groß, und es zeigt sich an diesen Stellen eine Vermischung des Blutplasmas mit der weniger eiweißhaltigen interstitiellen Flüssigkeit im Markparenchym. Die Untersucher konnten allerdings

nicht sicher klären, daß diese Undichtigkeiten der Sinusbegrenzung nicht Artefakte sind.
Dagegen konnten ZAMBONI und PEASE (6) nachweisen, daß die Endothelzellen in hohem Maß zum aktiven Transport befähigt sein müssen. Der schnelle Transport von kolloidalen Thorotrastteilchen durch die Endothelzellen aus dem Blut ins Mark ist durch passive Diffusion allein nicht zu erklären.
Diese Ergebnisse werden durch die Angaben von FUCHS (7) gestützt, der über eine Untersuchung an Nierenkapillaren von Meerschweinchen berichtet. Im Zuge der Artus-Reaktion entwickeln die Nierengefäße Lücken in der Basalmembran, und Kohlepartikel verlassen überall dort die Blutbahn, wo Leukozyten auf dem Weg der Diapedese die Basalmembran passieren.
Über die Anwesenheit von Lymphgefäßen im Knochen gibt es in der Literatur differierende Angaben. Während es im Knochenmark des Menschen nach BURKHARDT (8) keine Lymphgefäße geben soll, konnte DENNE (9) im modiolus cochleae des Meerschweinchens, der einen ähnlichen histologischen Aufbau zeigt wie die Kompakta des menschlichen Femur, Lymphgefäße nachweisen.
Alle diese Untersuchungsergebnisse über die Mikrozirkulation im Knochen sprechen für eine unter physiologischen Bedingungen gute Antibiotikapenetration aus dem Blut in den interstitiellen Flüssigkeitsraum des Knochens.

2.2 Zur Pathohistologie von bakteriellen Knocheninfektionen

Das histologische Bild der Knocheninfektion zeigt, daß sich im Mark das entzündliche Infiltrat entweder im zellreichen Markparenchym oder perivaskulär befindet und die harte Knochensubstanz von entzündlichem Gewebe umgeben ist und sich passiv verhält (1). Die Einschmelzung der Knochenbälkchen erfolgt erst sekundär. Sie ist wahrscheinlich durch die Folgen der entzünd-

lichen Reaktion bedingt wie z.B. pH-Änderung, Kollagenaseaktivität der Leukozyten, lokales Ödem, das die versorgenden Gefäße komprimiert (10), Verlegung der Gefäße durch Thromben und bakterienbeladene Emboli (11), sowie durch entzündliche Veränderungen im Sinne einer sekundären Endangiitis obliterans (1). Therapeutische Konsequenzen aus diesen Erkenntnissen hat POPKIROV (12) gezogen, der zur Steigerung des chemotherapeutischen Effekts die Zirkulationsverhältnisse durch fibrinolytische und Antikoagulantientherapie zu verbessern versuchte. Eine Ischämie allein kann histologische Befunde hervorrufen, wie sie für Knocheninfektionen typisch sind (10). In diesem Sinne ist das von KÖNN und POSTBERG (11) entworfene Modell einer "abakteriellen Osteomyelitis" zu sehen, bei dem infolge von Durchblutungsstörungen typische histologische Veränderungen des Knochengewebes verursacht werden, die sekundär zur bakteriellen Besiedlung disponieren.

Die Ausbreitung der bakteriellen Infektion erfolgt in der Spongiosa im zellreichen Markparenchym und im kompakten Knochen im lockeren perivasalen Bindegewebe der Volkmann'schen bzw. Havers'schen Kanäle (10). Die Hartsubstanz selbst ist nicht Aufenthaltsort von Bakterien und nimmt am Entzündungsprozeß nur insofern teil, als Milieuveränderungen des umgebenden Gewebes Einfluß auf den Knochenstoffwechsel nehmen.

Aus den Besonderheiten der Mikrozirkulation und der Gefäßarchitektur im Knochen sowie den Veränderungen bei Infektionen ergeben sich für die Chemotherapie folgende prinzipielle Konsequenzen: erstens muß das Chemotherapeutikum in ausreichend hoher Konzentration in den interstitiellen Flüssigkeitsraum des Knochens gelangen, denn hier ist der Aufenthaltsort der Bakterien; zweitens sollte die Chemotherapie möglichst früh genug einsetzen, bevor infektbedingte Veränderungen in den zuführenden Gefäßen eine ausreichende

Anflutung des Chemotherapeutikums unmöglich machen. NADE (13) gibt bei Therapiebeginn innerhalb der ersten drei Tage nach dem Auftreten der Symptome bis zu 70% Heilungserfolge bei der akuten hämatogenen Osteomyelitis an.

2.3 Zur Entwicklung von Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von Antibiotika im Knochen

Das gebräuchlichste Verfahren zur Knochenspiegelbestimmung von Antibiotika besteht bis heute darin, Knochenproben in toto zu homogenisieren und den Wirkstoff durch Zugabe einer auf das Knochengewicht bezogenen Flüssigkeitsmenge zu eluieren (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25). Die Wirkstoffkonzentration im Überstand des zentrifugierten Homogenats, dem sogenannten Eluat, wird mit mikrobiologischen Methoden gemessen. Die ermittelte Wirkstoffkonzentration wird als Antibiotikumkonzentration des Knochens bezeichnet und in µg/g Knochen ausgedrückt. Wird die Antibiotikumkonzentration des Knochens prozentual zur simultan gemessenen Serumkonzentration in Relation gesetzt, so spricht man von prozentualer Knochengängigkeit. Diese Methode ergibt bei vielen Antibiotika eine recht hohe prozentuale Knochengängigkeit. Allerdings sind die Streubreiten der Ergebnisse oftmals sehr groß. Aus der hohen prozentualen Knochengängigkeit werden gute Voraussetzungen für die Therapie der Osteomyelitis abgeleitet (22).

1971 berücksichtigten NORDEN und KENNEDY (26) erstmals bei Kaninchen den Blutanteil an reinen Kompaktaknochenproben. Sie bestimmten den Blutanteil des Knochens durch Messung der Hämoglobinkonzentration im Knochenhomogenat. Danach zogen sie die auf den Blutanteil entfallende Wirkstoffkonzentration von der im Knochen gemessenen Wirkstoffkonzentration ab. Bei ihren Untersuchungen mit Lincomycin fanden sie heraus, daß die Verfälschung der Wirkstoffkonzen-

trationen in der Kompakta durch den Blutanteil nur unwesentlich ist.
1974 führten ROSIN et al. (27) Untersuchungen über Gentamicinkonzentrationen im Knochen von Patienten durch. Die Knochenproben wurden in die Bestandteile Kompakta, Blutmark und Fettmark getrennt. Sie ermittelten den Blutanteil in den Knochen ebenfalls durch Bestimmung der Hämoglobinkonzentration in den Knochenhomogenaten. Diese Konzentrationen wurden als Prozentwert der Hämoglobinkonzentrationen im peripheren Blut der Patienten ausgedrückt. Ebenso wurden die Wirkstoffkonzentrationen in den Homogenaten prozentual auf die Gentamicinkonzentrationen im Serum bezogen. Die Differenz zwischen der Hämoglobinkonzentration und der Antibiotikumkonzentration in der Homogenatflüssigkeit, beide als Prozentwerte der parallelen Blut- bzw. Serumkonzentrationen berechnet, sollte den extravasalen Konzentrationsanteil des Antibiotikums anzeigen. Im Gegensatz zu VOLLENBRUCK (19), die in ihrer Untersuchung ohne Berücksichtigung des Blutanteils relativ hohe Gentamicinkonzentrationen im Knochen fand, ergab sich bei ROSIN et al. (27), daß die gemessenen Konzentrationen im Eluat nach einmaliger Gentamicininjektion fast völlig durch den Blutanteil bedingt waren und somit keine meßbaren extravasalen Wirkstoffkonzentrationen nachzuweisen waren. Im Eluat der Kompaktaproben lagen die Gentamicinkonzentrationen auch ohne Berücksichtigung des Blutanteils fast ausschließlich unterhalb der Nachweisgrenze für Gentamicin, die sich bei der verwendeten Methode bei 0,25 ug/g Knochen ergab.
An künftige Untersuchungen von Knochenkonzentrationen stellten daher ROSIN et al. (27) folgende Forderungen: erstens Trennung der Probe in die anatomischen Bestandteile des Knochens und zweitens Berücksichtigung des Blutanteils. Sie empfahlen die Bestimmung von

Hämoglobin zur Differenzierung von intra- und extravasalen Antibiotikumkonzentrationen in allen bluthaltigen Geweben.
Nach diesen Empfehlungen bestimmten VENT und LATURNUS (28) 1977 Konzentrationen von Azlocillin im menschlichen Knochen. Auch CUNHA (29) berücksichtigte 1977 den Blutanteil in der Knochenprobe. PLAUE (30) empfahl 1976 zur Differenzierung von intra- und extravasalen Antibiotikumkonzentrationen neben der Hämoglobinbestimmung die Messung der Immunglobulin M-Konzentration im Homogenat und im Serum. 1978 fand PLAUE (31), daß der Blutanteil in der Knochenprobe technisch einfacher und genauer durch die Hämoglobinbestimmung als durch die Konzentrationsbestimmung von künstlich zugeführtem, hochmolekularen Dextran zu quantifizieren ist.
Wurde der Blutanteil in den Knochenproben gesondert berücksichtigt, lagen die Knochenkonzentrationen stets in niedrigen Bereichen. Diese niedrigen Knochenkonzentrationen schienen die schlechten Therapieergebnisse bei Osteomyelitiden zu erklären. Nach den Ausführungen von ROSIN und NAUMANN (32) wurde aber bisher ebenfalls nicht beachtet, daß bei der Elution des Antibiotikums aus dem Knochen eine künstliche Verdünnung der tatsächlich im Knochen vorhandenen Konzentration erfolgt. Die Menge der zur Elution hinzugefügten Pufferlösung wurde am Knochengewicht orientiert. Es blieb unberücksichtigt, daß die schwere Hartsubstanz - das mit Kristallen imprägnierte Osteoid - einen hohen und in Abhängigkeit von der Untersuchungsprobe einen unterschiedlichen Anteil am Knochengewicht hat und durch ihr hohes Gewicht einen starken Verdünnungseffekt auf die Antibiotikumkonzentration in der Elutionsflüssigkeit ausübt.

3. Material und Methode

3.1 Probengewinnung

Das zu untersuchende Knochenmaterial wurde zehn Patienten bei orthopädischen Operationen entnommen.[1] Drei Patienten erhielten Umstellungsosteotomien am proximalen Femur und sieben einen prothetischen Hüftgelenksersatz.
Nach Einleitung der Narkose wurden jedem Patienten eine Blutprobe als Leerwert entnommen und danach 2 g Cefotaxim i.v. injiziert. Während der Operation wurden ein oder mehrere Knochenstücke gewonnen und gleichzeitig pro Knochenstück 2 Blutproben abgenommen, eine Probe zur Serumgewinnung und eine Probe in einem mit EDTA beschichteten Röhrchen zur Hämoglobinbestimmung.

3.2 Präparation und Elution

Die Knochenproben wurden von Bindegewebe und Periost befreit und möglichst sorgfältig nach dem makroskopischen Aspekt in die Bestandteile Kompakta, Fettmark und Blutmark zerlegt. Anschließend wurden die Teilstücke gewogen (Feuchtgewicht) und im Verhältnis 2:1 (Volumen/Gewicht) mit Phosphatpuffer pH 6.5 überschichtet. Bei sehr geringen Knochenmengen wurde ein Mehrfaches des Knochengewichts an Puffer hinzugefügt, um eine genügend große Flüssigkeitsmenge zum Nachweis des Cefotaxim zu erhalten. Die Spongiosaproben wurden dann mit einem Homogenisator (Hersteller E.Bühler, Tübingen) zerkleinert. Um die geringe

---

[1] Herrn Dr.med. J.Vent, Orthopädische Universitätsklinik Düsseldorf (Dir. Prof.Dr. K.-P. Schulitz), danken wir herzlich für die Gewinnung und Überlassung der Untersuchungsproben.

im Homogenisator verbleibende Verlustmenge zu erfassen, wurde nach der Homogenisation nochmals gewogen. Die Kompaktaproben wurden bereits vor Zugabe des Puffers mit einem Stahlmörser zerkleinert (27). Zur vollständigen Extraktion wurden die Suspensionen über Nacht, d.h. im Durchschnitt 18 Stunden, im Kühlschrank bei ca. + 4° C aufbewahrt.
Parallel dazu wurden in Knochenhomogenat und menschlichem Serum angesetzte Cefotaximstandards gelagert. Das Knochenhomogenat zur Herstellung des Standards wurde aus zermörsertem Leichenknochen gewonnen. Es hatte, wie das für die Standardverdünnungen benutzte, gepoolte Humanserum, keine antibakterielle Eigenaktivität gegen den Testkeim.
Die Knochenhomogenate wurden am darauffolgenden Tag zentrifugiert. Anschließend wurden im Überstand die Konzentrationen von Hämoglobin, Immunglobulin M und Cefotaxim gemessen.
Die Knochensedimente dienten zur Bestimmung des Trockengewichts der ursprünglichen Knochenprobe.
Die in den Knochensedimenten enthaltene wässrige Flüssigkeit, ein Gemisch aus Pufferlösung und ursprünglichem Knochenwasser, wurde im Heißluftsterilisator bei 120° C verdampft. Diese Temperatur wurde nicht überschritten, um die Verdampfung von Knochenfett zu vermeiden.
Die Dauer der Verdampfung mußte der Zusammensetzung der Knochenprobe angepaßt werden. Sie wurde beendet, wenn eine zweistündige Erhitzung zwischen zwei Kontrollwägungen das Gewicht der Knochenprobe nicht weiter reduzierte. Dieses Gewicht wurde als Knochentrockengewicht definiert.
Die Differenz zwischen Knochenfeuchtgewicht und Knochentrockengewicht ergab die Menge an Knochenwasser, die sich aus interstitieller Knochenflüssigkeit, intrazellulärer Flüssigkeit und Blutplasma zusammensetzt.

3.3 Hämoglobin- und Immunglobulin M - Bestimmung

Zur Ermittlung des Blutanteils am Knochenwasser wurden die Hämoglobin- und Immunglobulin M - Konzentrationen in den Knochenhomogenaten und den Blut- bzw. Serumproben der Patienten bestimmt.
Die Bluthämoglobinkonzentrationen wurden photometrisch mit der Hämiglobincyanid-Methode gemessen.
Die Hämoglobinbestimmung in den Eluaten wurde nach dem Vorschlag von ROSIN et al. (27) durchgeführt. Die scharf zentrifugierten Eluate wurden abpipettiert, das Hämoglobin und seine Derivate wurden in Hämiglobin-Cyanid überführt und die Extinktion im Spektralphotometer bei 540 und 680 nm gemessen. Die Messung bei 680 nm diente der Ermittlung des Leerwertes, diejenige bei 540 nm der Ermittlung der Hämoglobin-Derivate (33). Die Ermittlung des Leerwertes bei 680 nm ermöglicht die Elimination des Fehlers, der durch Trübungen des scharf zentrifugierten Homogenats entsteht. Mit dieser bei RICHTERICH (33) ausführlich dargestellten Methode lassen sich Konzentrationen von Hämoglobin und seinen Derivaten bis 5 mg/100 ml ausreichend genau messen.
Die Immunglobulin M - Konzentrationen in den Seren und Homogenaten wurden mit der Tri-Partigen^{R}-Immundiffusion bzw. der LC-Partigen^{R}-Immundiffusion nach den Angaben der Behringwerke AG, Marburg bestimmt.
Alle Immunglobulin M - und Hämoglobinkonzentrationen wurden jeweils in Doppelbestimmungen ermittelt.

3.4 Agardiffusionstest

Die Cefotaximkonzentrationen in den Serumproben und Knochenhomogenaten wurden mit dem Agardiffusionstest ermittelt. Die als Leerwert vor der Injektion von Cefotaxim entnommene Serumprobe durfte keine antibakterielle Eigenaktivität zeigen.

Zur Bestimmung der Serumkonzentration von Cefotaxim wurden 80 ml Mueller-Hinton-Agar pH 7.0 mit 0.3 ml einer Sporensuspension von Bac. subtilis ATCC 6633 (2.4×10^6 Sporen/ml) bei 70° C blasenfrei in eine plangeschliffene Hemmhoftestküvette (27 cm x 16 cm) gegossen. Mit diesem Testkeim liegt die untere Nachweisgrenze für Cefotaxim im Serum bei ca. 1 µg/ml ausreichend niedrig.

Für pharmakokinetische Untersuchungen im Knochen ist jedoch eine höhere Empfindlichkeit erforderlich. Daher wurde für die Untersuchung der Knochenhomogenate der gegen Cefotaxim besonders empfindliche Testkeim[1] E.coli V 6311/65 benutzt. Die untere Nachweisgrenze konnte so auf 0.1 µg/ml gesenkt werden. Ein ml einer E.coli-Suspension mit ca. 2.2×10^7 Keimen/ml wurde dem Mueller-Hinton-Agar kurz vor dem Ausgießen bei exakt 56° C zugegeben. Bereits geringe zeitliche Verschiebungen und Abweichungen von dieser Temperatur beeinflußten die resultierende Koloniedichte in der Testküvette wesentlich.

In jeder Testküvette wurde eine homologe Standardverdünnungsreihe mitgeführt. Nach dreistündiger Vordiffusion bei Zimmertemperatur wurden die Platten 24 Stunden bei 37° C inkubiert.

Die Hemmhöfe wurden mit einem Spezialmeßgerät in zwei Ebenen ausgemessen und der arithmetische Mittelwert berechnet (34). Aus den Konzentrationen und Hemmhofdurchmessern des Standards wurde die Gleichung der Regressionsgeraden ermittelt, mit deren Hilfe die Cefotaximkonzentrationen der Patientenproben in der jeweiligen Testküvette errechnet werden konnten. Für jede Untersuchungsprobe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

---

[1] Herrn Dr. E. Schrinner, Hoechst AG Frankfurt, danken wir herzlich für die Überlassung dieses Teststammes.

Aus den Immunglobulin M - und Hämoglobinkonzentrationen in den Homogenaten und den korrespondierenden Werten im Vollblut bzw. Serum kann der prozentuale Blut- bzw. Serumanteil im Knocheneluat errechnet werden. Das Volumen der Homogenatflüssigkeit setzt sich aus der zugegebenen Puffermenge und dem Knochenwasser zusammen. Mit der Größe dieses Volumens und der zugehörigen Hämoglobinkonzentration läßt sich die absolute Hämoglobinmenge im Knochen berechnen. Aus der absoluten Hämoglobinmenge im Knochen und der Hämoglobinkonzentration im Vollblut kann die Blutmenge in der Knochenprobe quantitativ abgeleitet werden. Analoge Berechnungen mit Hilfe der Immunglobulin M - Konzentrationen in Homogenat und Serum führen zur absoluten Serummenge in der Knochenprobe.
Die Cefotaximkonzentration in der Homogenatflüssigkeit resultiert sowohl aus den durch Pufferzugabe verdünnten intravasalen Cefotaximspiegeln im Serum als auch aus den extravasalen Cefotaximkonzentrationen im Knochenwasser (Summe aus interstitieller und intrazellulärer Knochenflüssigkeit). Aus dem Volumen der Homogenatflüssigkeit und ihrer Cefotaximkonzentration läßt sich die Absolutmenge von Cefotaxim in der Knochenprobe berechnen.
Aus der Blut- bzw. Serummenge in der Knochenprobe und der Cefotaximkonzentration im Serum läßt sich die Cefotaximmenge, die auf den Blutanteil in der Knochenprobe zurückgeht, quantitativ bestimmen. Die Differenz zwischen der Gesamtmenge Cefotaxim in der Knochenprobe und der blutbedingten Cefotaximmenge ergibt die Cefotaximmenge, die im extravasalen Knochenwasser enthalten ist. Das Volumen des extravasalen Knochenwassers errechnet sich aus dem Volumen der Homogenatflüssigkeit abzüglich dem Volumen der zugegebenen Pufferlösung und dem Volumen des Blutanteils in der Knochenprobe.

Wird die extravasale Cefotaximmenge auf das Volumen des extravasalen Knochenwassers bezogen, so ergibt sich eine Konzentration mit der Maßeinheit µg Cefotaxim/ml extravasales Knochenwasser. Diese Konzentrationsangabe differenziert noch nicht zwischen der interstitiellen Flüssigkeit und der extravasalen intrazellulären Flüssigkeit. In zellreichen Geweben, z.B. im Knochenmark, ist die gemessene Antibiotikumkonzentration durch den intrazellulären Flüssigkeitsanteil relativ stark verdünnt. In zellarmem Gewebe, z.B. in der Kompakta, entspricht die gemessene Antibiotikumkonzentration weitgehend der Konzentration der interstitiellen Flüssigkeit im Knochen.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden aus 20 Serum- und 20 Knochenproben ermittelt, die bei 10 Patienten nach einmaliger i.v. Injektion von 2 g Cefotaxim entnommen wurden. Der Zeitpunkt der Probenentnahme variierte zwischen 10 und 35 Minuten nach der Injektion.
Die Abb. 1 zeigt die Cefotaximkonzentrationsverläufe im Serum von 6 Patienten, bei denen während der Operation mehr als eine Probenentnahme erfolgte. Das arithmetische Mittel der 6 individuellen Halbwertzeiten von Cefotaxim beträgt 42 Minuten. Dieser Wert ist etwas kleiner als die Cefotaximhalbwertzeit bei gesunden Probanden, die von HO et al. (35) mit 0.86 Stunden, entsprechend 52 Minuten, angegeben wird.
Aus den Konzentrationsverläufen wurden die individuellen Halbwertzeiten mit der Formel $t_{50\%} = -\frac{\ln 2}{K_2}$ errechnet, wobei K_2 die Eliminationskonstante bezeichnet. Nach i.v. Injektion kann die Wirkstoffkonzentration c durch die Formel $-\frac{dc}{dt} = K_2$ ausgedrückt werden. Die Integration dieser Differentialgleichung ergibt die Beziehungen $c_t = c_o\, e^{-K_2 t}$; $c_{t50\%} = \frac{1}{2} c_o$; $\frac{1}{2} c_o = c_o\, e^{-K_2 t50\%}$; daraus resultiert durch Kürzung von c_o $t_{50\%} = -\frac{\ln 2}{K_2}$.
Die Pharmakokinetik von Cefotaxim wird während der Operation durch unphysiologische Einflüsse, wie z.B. Blutverluste, Infusionen und Änderung der Nierendurchblutung, verändert. Bei den untersuchten Patienten zeigen der Abfall der Hämoglobinkonzentration und der Abfall der Konzentration von Immunglobulin M während der Operation zum Teil erhebliche Blutverluste und Blutverdünnungen durch Infusionen an. In Tabelle 1 sind die Serumkonzentrationen von Cefotaxim mit den entsprechenden intraoperativen Änderungen der Konzentrationen von Hämoglobin und Immunglobulin M aufgeführt. Diese Faktoren tragen zu der starken Streuung

Abbildung 1: Cefotaximkonzentrationen im Serum von 6 Patienten nach intravenöser Injektion von 2 Gramm Cefotaxim.

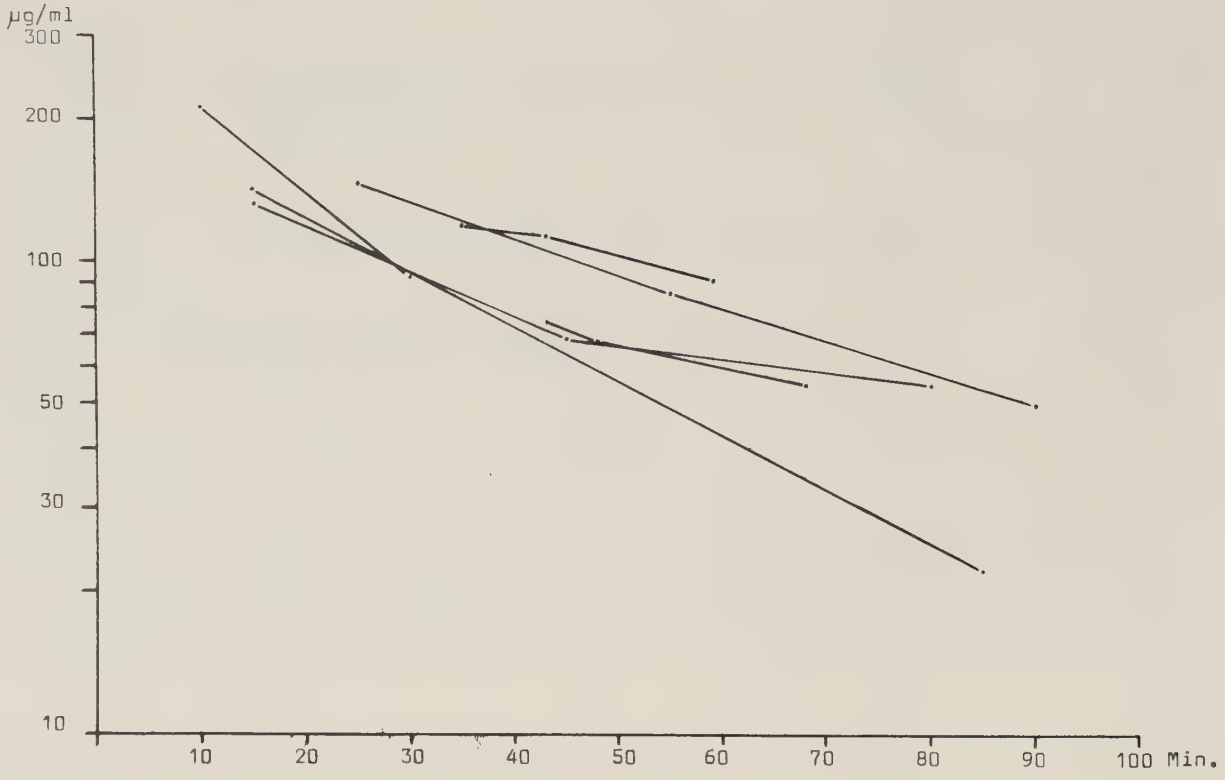


Tabelle 1: Einzelwerte der intraoperativen Konzentrationen von Cefotaxim (CTX) und Immunglobulin M (IgM) im Serum, sowie der prä- und intraoperativen Konzentrationen von Hämoglobin im Vollblut und der jeweiligen Zeitintervalle zwischen der Cefotaximinjektion und der Probenentnahme.

Nr.	Geschlecht	Alter	Gewicht (Kg)	Halbwertzeit (Min.)	Intervall (Min.)	CTX-Konz. (µg/ml)	Hb.-Konz. intraop. (g%)	IgM-Konz. intraop. (mg%)	Hb.-Konz. präop. (g%)
1	w.	14	46		155	28	9.9		14.0
2	w.	22	68		45	87	11.1		15.2
3	w.	19	53		40	73	11.1		14.6
4	m.	59	69		25	163	10.8		13.4
5	w.	34	39	17	10	211	9.7	187	9.9
					30	93	8.9	180	
6	w.	60	70	26	15	142	8.5	76	12.9
					85	22	5.3	30	
7	w.	86	50	57	35	120	12.4	90	13.8
					43	116	11.7	89	
					59	91	11.2	90	
8	m.	72	77	58	43	75	13.8	76	13.8
					48	68	13.7	76	
					68	55	13.5	78	
9	w.	71	65	41	25	148	13.4	99	14.8
					55	87	12.9	89	
					90	50	13.5	107	
10	w.	67	88	52	15	132	11.4	99	11.8
					45	69	11.0	81	
					80	55	11.2	86	

der individuellen Konzentrationsverläufe bei. Eine weitere Ursache dieser Ergebnisstreuung besteht darin, daß allen Patienten unabhängig von ihrem Körpergewicht 2 g Cefotaxim verabreicht wurden. Die Körpergewichte lagen zwischen 39 und 88 Kilogramm.
Die Tabelle 2 zeigt die Cefotaximkonzentrationen in den Knochenhomogenaten der Knochenproben von Blutmark, Fettmark und Kompakta. Die gemessene Konzentration der Homogenate wurde auf 1 Gramm der untersuchten Knochenprobe umgerechnet und trägt die Maßeinheit µg Cefotaxim/ g Knochen.
In den folgenden Abbildungen und Tabellen sind die im Homogenat der Blutmark-, Fettmark- und Kompaktaproben gemessenen Cefotaximkonzentrationen den Werten gegenübergestellt, die sich jeweils nach Abzug des Blutanteils und nach Berücksichtigung des Anteils an Hartsubstanz ergeben.
In Tabelle 3 sind die auf diese Weise aufgeschlüsselten Cefotaximkonzentrationen der Kompaktaproben aufgeführt, d.h. die Cefotaximkonzentrationen erstens der Homogenate, zweitens der Homogenate nach Abzug des jeweiligen Blutanteils und drittens der interstitiellen Knochenflüssigkeit nach zusätzlicher Berücksichtigung der Hartsubstanz. Die Meßergebnisse sind zum einen als Prozentwert der entsprechenden Cefotaximserumkonzentration, zum anderen als absolute Konzentration ausgedrückt. Die Kompaktaproben der Patienten 9 und 10 fehlen in dieser Tabelle, da die Probenvolumina zu klein waren und die Meßergebnisse nicht durch Doppelbestimmungen gesichert werden konnten.
In Spalte 2 sind die Cefotaximkonzentrationen des Homogenats als Prozentwerte der entsprechenden Cefotaximserumkonzentrationen aufgeführt. Diese Methode der Ermittlung und Darstellung von Knochenspiegeln ist im Schrifttum am häufigsten vertreten. Der Blutanteil im Homogenat ist dabei nicht berücksichtigt.

Tabelle 2: Darstellung der Konzentrationen von Cefotaxim (CTX) in den Homogenaten der Knochenproben, jeweils umgerechnet auf ein Gramm untersuchte Knochenprobe.

Nr.	Patient	Entnahmestelle der Knochenprobe	CTX-Konz. im Serum (µg/ml)	CTX-Konz. im Homogenat (µg CTX/g Knochen) Blutmark	Fettmark	Kompakta
1	S.W.	Schaft	28	1.6		0.8
2	M.L.-T.	Schaft	87	6.2		1.7
3	U.G.	Schaft	73	4.6		3.2
4	W.S.	Kopf	163		15.2	8.5
5	H.H.	Kopf	211	25.6		28.4
		Schaft	93	15.0		
6	A.K.	Kopf	142	6.8		
		Schaft	22	1.9		
7	K.P.	Kopf	120	11.1		6.8
		Pfanne	116	10.3		
		Schaft	91	10.5		
8	E.H.	Kopf	75		14.1	6.4
		Pfanne	68	9.2		
		Schaft	55	7.4		
9	E.P.	Kopf	148	4.6		
		Pfanne	87	5.2		4.6
		Schaft	50	3.3	2.3	
10	A.B.	Kopf	132	7.6		
		Pfanne	69	9.5		9.8
		Schaft	55	4.1		

Tabelle 3: Die Spalten 1 - 6 enthalten die Konzentrationen von Cefotaxim (CTX) in Kompaktaproben als Prozent- bzw. Absolutwerte im Knochenhomogenat, im Homogenat nach Abzug des Blutanteils und in der interstitiellen Knochenflüssigkeit (ISF) nach Berücksichtigung der Hartsubstanz.

		Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5	Spalte 6
Nr.	Herkunft der Knochenprobe	CTX-Konz. im Homogenat (µgCTX/gKnochen)	CTX-Konz. im Homogenat als Prozentwert der CTX-Serumkonz. (%)	wie Spalte 2 mit Abzug des Blutanteils (%)	CTX-Konz. in der ISF als Prozentwert der CTX-Serumkonz. (%)	CTX-Konz. im Homogenat mit Abzug des Blutanteils (µgCTX/gKnochen)	CTX-Konz. in der ISF (µg CTX/ml)
1	Schaft	0.8	3.14	2.54	23.9	0.71	6.7
2	Schaft	1.7	1.98	1.91	16.1	1.67	14.0
3	Schaft	3.2	4.44	2.34	21.2	1.71	15.5
4	Kopf	8.5	5.23	3.45	25.6	5.62	41.7
7	Kopf	6.8	5.67	3.85	27.4	4.62	32.9
8	Kopf	6.4	8.47	6.67	42.8	5.00	32.1
		$\bar{x}_g$ = 3.42	$\bar{x}_g$ = 4.37	$\bar{x}_g$ = 3.17	$\bar{x}_g$ = 25.01	$\bar{x}_g$ = 2.53	$\bar{x}_g$ = 20.00

Wird er durch Messung der Hämoglobinkonzentration im Homogenat errechnet und die auf den Blutanteil zurückgehende Cefotaximkonzentration abgezogen, ergeben sich die Werte in Spalte 3. Sie liegen im Mittel bei 3.17% der zugehörigen Serumkonzentrationen. Diese Werte sind künstlich niedrig, da das Gewicht der Hartsubstanz methodisch bedingt einen Verdünnungseffekt zur Folge hat. Werden die gemessenen Konzentrationen nach Berücksichtigung der Hartsubstanz auf das Volumen der interstitiellen Knochenflüssigkeit bezogen, so erhöhen sie sich, wie in Spalte 4 dargestellt, auf einen Mittelwert von 25%. Die Spalten 5 bzw. 6 zeigen statt der Prozentwerte der Spalten 3 und 4 die entsprechenden absoluten Cefotaximkonzentrationen in µg/ml.

In Tabelle 4 sind die Cefotaximkonzentrationen im Homogenat von Blutmarkproben als Prozentwerte der entsprechenden Cefotaximserumkonzentrationen aufgeführt. Die Einzelwerte und der geometrische Mittelwert sind der Spalte 2 zu entnehmen. Wird der Blutanteil bei diesen Knochenproben ebenfalls mit Hilfe der Hämoglobinkonzentration im Homogenat errechnet, würden sich bei allen Proben negative Werte ergeben (vgl. Spalte 3), weil das extravasale Hämoglobin in den präerythrozytären Markzellen einen zu hohen Blutanteil in diesen Knochenproben vortäuscht.

Die Knochenproben von Patient 5 sind weder in Tabelle 3 noch in Tabelle 4 berücksichtigt, da der Patient unter einer Chondrodystrophie litt und die Knochenproben keinen normalen anatomischen Aufbau zeigten.

In den Abbildungen 2 und 3 sind die Einzelwerte und die geometrischen Mittelwerte der Tabellen 3 und 4 graphisch dargestellt. Die Säulen 1,2,3 und 4 der Abbildung 2 entsprechen den Spalten 2 und 3 der Tabelle 4 und den Spalten 2 und 3 der Tabelle 3. Die Säulen 1,2,3 und 4 der Abbildung 3 entsprechen den Spalten 3,4,5 und 6 der Tabelle 3.

Tabelle 4: Die Spalten 1 und 2 enthalten die Konzentrationen von Cefotaxim (CTX) im Homogenat von Blutmarkproben als Absolutwerte bzw. als Prozentwerte der entsprechenden Serumkonzentrationen von Cefotaxim. Die Berücksichtigung des Blutanteils mit Hilfe der Hämoglobinbestimmung ist bei Blutmarkproben nicht möglich (Spalte 3).

		Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3
Nr.	Herkunft der Knochenprobe	CTX-Konz. im Homogenat (µg CTX/g Knochen)	CTX-Konz. im Homogenat als Prozentwert der CTX-Serumkonz. (%)	wie Spalte 2 mit Berücksichtigung des Blutanteils (%)
1	Schaft	1.6	5.71	-
2	Schaft	6.2	7.16	-
3	Schaft	4.6	6.27	-
6	Kopf	6.8	4.81	-
	Schaft	1.9	8.77	-
7	Kopf	11.1	9.26	-
	Pfanne	10.3	8.90	-
	Schaft	10.5	11.56	-
8	Pfanne	9.2	13.46	-
	Schaft	7.4	13.37	-
9	Kopf	4.6	3.14	-
	Pfanne	5.2	6.02	-
	Schaft	3.3	6.50	-
10	Kopf	7.6	5.77	-
	Pfanne	9.5	13.70	-
	Schaft	4.1	7.51	-
		$\bar{x}_g$ = 5.67	$\bar{x}_g$ = 7.64	

Abbildung 2:

Die Säulen 1 und 3 zeigen die Einzelwerte und die geometrischen Mittelwerte der Cefotaximkonzentrationen in den Homogenaten von Blutmark (1) und Kompakta (3) als Prozentwert der Serumspiegel. Die Säulen 2 und 4 zeigen die entsprechenden Werte nach Berücksichtigung des in den Knochenproben enthaltenen Blutanteils, der durch die Messung der Hämoglobinkonzentrationen in den Homogenaten bestimmt wurde.

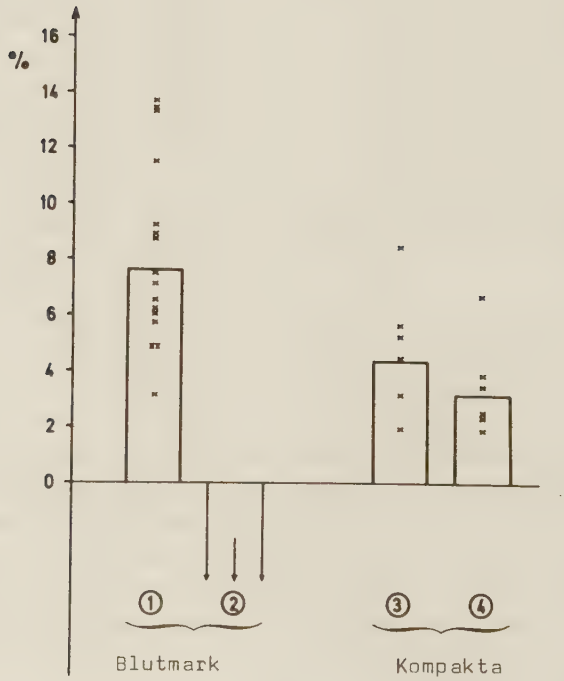
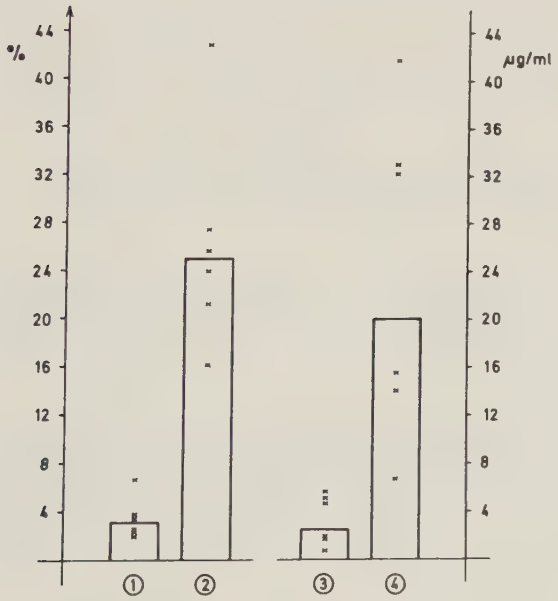


Abbildung 3:

Die Säulen 1 und 3 zeigen die Einzelwerte und die geometrischen Mittelwerte der Cefotaximkonzentrationen in den Homogenaten von Kompaktaproben nach Berücksichtigung des Blutanteils als Prozentwerte der Serumspiegel und als absolute Konzentrationen. Die Säulen 2 und 4 zeigen die entsprechenden Werte nach zusätzlicher Berücksichtigung des Gewichts der Knochenhartsubstanz.
Die geometrischen Mittelwerte der Säulen 1 und 3 bzw. 2 und 4 zeigen annähernd gleiche Werte, da der geometrische Mittelwert der entsprechenden Cefotaximkonzentrationen im Serum bei 80 µg/ml liegt.



5. Diskussion

5.1 Zur einfachen Homogenisation

Das gebräuchlichste Verfahren zur Bestimmung sogenannter Knochenspiegel besteht bis heute darin, Knochenproben in toto zu homogenisieren und das Antibiotikum durch Zugabe einer auf das Knochengewicht bezogenen Flüssigkeitsmenge zu eluieren (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25). Seit 1971 berücksichtigten mehrere Autoren (26, 27, 28, 29, 30, 31) den Blutanteil in den Knochenproben. Sie bestimmten den Blutanteil des Knochens durch die Messung der Hämoglobinkonzentration im Knochenhomogenat und zogen die auf den Blutanteil entfallende Wirkstoffkonzentration von der in der gesamten Knochenprobe gemessenen Wirkstoffkonzentration ab. Bei diesen Untersuchungen blieb aber unberücksichtigt, daß die schwere Knochenhartsubstanz - das mit Kristallen imprägnierte Osteoid - einerseits einen hohen Anteil am Knochengewicht hat und andererseits kein Antibiotikum enthält.

Erfolgt die Wirkstoffelution mit einer auf das Gesamtgewicht der Knochenprobe bezogenen Puffermenge, so ist diese erheblich größer als das Volumen der interstitiellen Knochenflüssigkeit. Die gemessenen Antibiotikakonzentrationen sind dadurch niedriger als die Konzentrationen in der interstitiellen Knochenflüssigkeit.

In der vorliegenden Arbeit wird das Gewicht der Hartsubstanz in den Knochenproben gemessen, und es wird dadurch das Volumen der extravasalen Flüssigkeit berechenbar. Das Ziel ist, Cefotaximkonzentrationen in der interstitiellen Knochenflüssigkeit zu messen, da dort die Antibiotika auf die Bakterien einwirken.

Die Abb. 4 zeigt eine schematisch dargestellte Unterteilung der Kompakta- und Blutmarkproben in die Bestandteile Knochenhartsubstanz, extravasale Zellen,

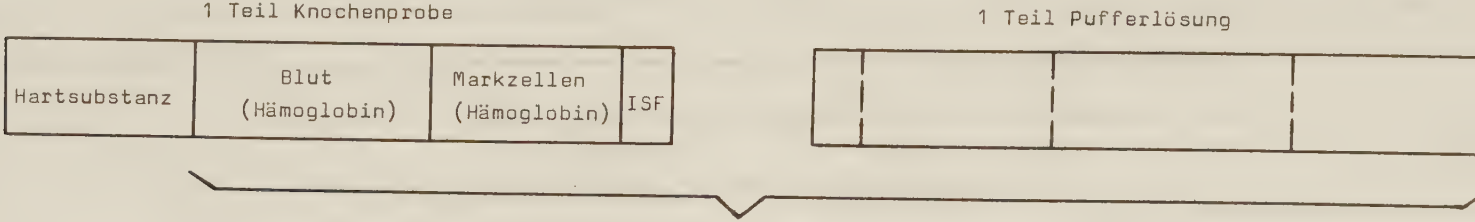
interstitielle Flüssigkeit und Blut, sowie der Fettmarkproben in die Bestandteile Knochenhartsubstanz, intrazelluläres Wasser und intrazelluläres Fett der extravasal liegenden Zellen, interstitielle Flüssigkeit und Blut.
Das Volumen der interstitiellen Knochenflüssigkeit wird berechenbar, wenn die Volumina der Hartsubstanz, des Blutes, des intrazellulären Fetts und des intrazellulären Wassers der extravasal liegenden Zellen bekannt sind. Das Blutvolumen kann über die Hämoglobinkonzentration bestimmt werden. Die Volumina der Hartsubstanz und des Fetts können über das Trockengewicht der Knochenprobe ermittelt werden. Lediglich das intrazelluläre Wasser ist mit der angewandten Methode von der interstitiellen Knochenflüssigkeit nicht quantitativ abtrennbar. Da wahrscheinlich kein Cefotaxim in die Zellen gelangt, verdünnt das intrazelluläre Wasser der extravasal liegenden Zellen nach der Homogenisation der Knochenprobe die Wirkstoffkonzentration in der interstitiellen Knochenflüssigkeit. In der zellarmen Kompakta kann man aber davon ausgehen, daß der extravasale Flüssigkeitsraum annähernd der interstitiellen Knochenflüssigkeit entspricht (s. Abb. 4a). Damit ist der Verdünnungseffekt zu vernachlässigen.
Auch für Fettmarkproben ist der Verdünnungseffekt durch das intrazelluläre Wasser gering, da die Fettzellen überwiegend Fett und nur wenig Wasser enthalten (s. Abb. 4b).
Wesentlich größer dürfte der Verdünnungseffekt im zellreichen Blutmark sein (s. Abb. 4c), das die wasserreichen spezifischen Zellen des blutbildenden Marks enthält.

Abbildung 4: Differenzierung der Kompartimente des Knochens, und Bestimmung der Volumina der Verteilungsräume für Cefotaxim in Kompakta, Fettmark und Blutmark.

Abb. 4a: Kompakta

Abb. 4b: Fettmark

Abb. 4c: Blutmark



Volumen des flüssigen Überstands nach Zentrifugation des Homogenats

[Das Volumen des Blutanteils in der Knochenprobe ist durch Messung der Hämoglobinkonzentration im Homogenat nicht zu bestimmen, da eine Differenzierung zwischen intra- und extravasalem Hämoglobin nicht möglich ist.]

5.2 Zur Ermittlung des Blutanteils durch die Hämoglobinkonzentrationsbestimmung

Zur Ermittlung des Blutanteils an der Knochenprobe wird die Hämoglobinkonzentration im Knochenhomogenat gemessen. Die im roten Mark liegenden Zellen der Erythropoese enthalten bereits von der Entwicklungsstufe der polychromatischen Makroblasten an Hämoglobin. THORELL (36) konnte durch mikrospektrophotometrische Untersuchungen zeigen, daß bereits frühe Erythroblasten etwa 50% des Hämoglobins eines Erythrozyten enthalten. Die orthochromatischen Normoblasten enthalten genausoviel Hämoglobin wie Erythrozyten (37).
Dieses extravasal liegende Hämoglobin wird bei der Hämoglobinbestimmung des Knochenhomogenats mitgemessen und täuscht eine viel zu hohe Blutmenge in der Knochenprobe vor. Entsprechend wird eine zu hohe Cefotaximmenge abgezogen. Bei den Blutmarkproben kommt es sogar dazu, daß die Cefotaximmenge, die sich für den fälschlich zu hoch gemessenen Blutanteil errechnen läßt, größer ist als die in der Knochenprobe gemessene Cefotaximmenge (s. Tab. 4).

5.3 Zur Ermittlung des Serumanteils durch die Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen der Klasse M

Zur Ermittlung des Serumanteils in der Knochenprobe wurde von PLAUE (30) die Konzentration von Immunglobulin M im Knochenhomogenat in der Annahme gemessen, daß die Makroglobuline die Kapillarwand nicht passieren. Aber ebenso wie das Hämoglobin befinden sich Immunglobuline der Klasse M nicht streng intravasal. Im Knochenmark liegen zahlreiche Lymphozyten perivaskulär, zum Teil sogar zu "Lymphfollikeln" zusammengeballt (37). B-Lymphozyten tragen auf der Oberfläche ca. 50000 - 100000 Immunglobulinmoleküle pro Zelle. Die meisten gehören zur Klasse M (38).

Beim Aufbereiten der Knochenproben werden die Lymphozyten mechanisch zerstört. Die freiwerdenden Oberflächenimmunglobuline gehen wahrscheinlich in die Immunglobulin M-Konzentrationsbestimmung ein. Weiterhin sind die Plasmazellen zu berücksichtigen, in denen die humoralen Antikörper gebildet werden. Jede Plasmazelle ist Ausdruck einer aktiven Antikörpersynthese (39). Das Knochenmark ist reich an Plasmazellen, die überwiegend perikapillär liegen. Aber auch in den Gefäßscheiden der Havers'schen und Volkmann'schen Kanäle fand DENNE (9) beim modiolus cochleae des Meerschweinchens Plasmazellen. So könnte auch die Bestimmung von Immunglobulin M in der Kompakta eine Fehlerquelle enthalten, die zu fälschlich zu hoch berechneten Serummengen führt. Für die Kompaktaproben dürfte der Fehler im Gegensatz zu den Spongiosaproben wegen der geringeren Zahl an Plasmazellen deutlich kleiner sein. Somit sind also alle mit Hilfe der Konzentrationsbestimmung von Immunglobulin M errechneten Cefotaximkonzentrationen in der interstitiellen Knochenflüssigkeit fälschlicherweise mehr oder weniger zu niedrig ermittelt worden.

5.4 Zur Wirkstoffkonzentration im Vollblut und im Serum

Wie die anderen Cephalosporine dürfte Cefotaxim bei mittlerer Dosierung nicht in die Erythrozyten penetrieren (40). Der Verteilungsraum für Cefotaxim ist nicht das Vollblutvolumen, sondern das Plasmavolumen, d.h. Vollblutvolumen minus Hämatokrit. Liegt kein extravasales Hämoglobin vor, so wird über die Messung der Hämoglobinkonzentration im Homogenat das Vollblutvolumen in der Knochenprobe bestimmt. Die Wirkstoffkonzentration ist bei Substanzen, die nicht in die Erythrozyten eindringen, pro ml Serum stets höher als die Konzentration pro ml Vollblut. Wird die Cefotaximmenge im Blutanteil der Knochenprobe

auf der Basis der Vollblutmenge in der Knochenprobe und der peripheren Serumkonzentration von Cefotaxim errechnet, so ergibt sich ein zu hoher blutbedingter Cefotaximanteil in der Knochenprobe. Die resultierende Cefotaximkonzentration in der interstitiellen Flüssigkeit ist demzufolge zu niedrig ermittelt.
Zur Vermeidung dieser Fehlerquelle können zwei Möglichkeiten diskutiert werden:

1.) Über eine Hämatokritbestimmung könnten Vollblutmenge und Plasmamenge differenziert werden.
2.) Im peripheren Blut des Patienten könnten für das Cefotaxim statt der Serumkonzentrationen Vollblutkonzentrationen bestimmt werden. Dies könnte z.B. mit Hilfe von Saponinen erreicht werden, die in geringsten Mengen eine starke Hämolyse verursachen (41).

Die Differenzierung zwischen den Cefotaximkonzentrationen im Serum und im Vollblut ist bei der Berechnung der absoluten Cefotaximmengen in den verschiedenen Kompartimenten einer Knochenprobe von Bedeutung. Sie ist jedoch nicht nötig, wenn die im Knochenhomogenat gemessenen Hämoglobin- und Cefotaximkonzentrationen lediglich als Prozentwerte der peripheren Vollblut- bzw. Serumkonzentrationen ausgedrückt werden.
Zusammengefaßt gibt es vier Fehlerquellen, die zu fälschlich niedrig berechneten Ergebnissen bei der Ermittlung von Antibiotikumkonzentrationen in der interstitiellen Knochenflüssigkeit führen:

1.) Die intrazelluläre Flüssigkeit der extravasal liegenden Zellen übt einen Verdünnungseffekt aus.
2.) Hämoglobin ist im blutbildenden Mark auch extravasal in größerer Menge vorhanden und führt zur falschen Berechnung zu hoher Blutanteile in den Knochenproben.
3.) Da auch Immunglobuline in Kompakta und Spongiosa extravasal vorhanden sind, führt die Konzentrations-

bestimmung von Immunglobulinen der Klasse M zur falschen Berechnung zu hoher Serumanteile in den Knochenproben.

4.) Wird die Cefotaximmenge im Blutanteil der Knochenprobe auf der Basis der Vollblutmenge in der Knochenprobe und der peripheren Serumkonzentration von Cefotaxim errechnet, so ergibt sich ein zu hoher blutbedingter Cefotaximanteil in der Knochenprobe. Die resultierende Cefotaximkonzentration in der interstitiellen Knochenflüssigkeit wird demzufolge zu niedrig ermittelt.

Diese Fehlerquellen wirken sich auf Meßergebnisse von Homogenaten, die rotes Knochenmark enthalten, besonders stark aus. Keines der bisher angewandten Untersuchungsverfahren führt bei solchen Knochenproben zu Ergebnissen, die definierbar und richtig interpretierbar sind.

Die in dieser Studie benutzte Methode kann für Fettmark- und Kompaktaproben verwertbare Ergebnisse liefern. Die Fehler durch das intrazelluläre Wasser der extravasal liegenden Zellen und durch extravasales Hämoglobin sind bei solchen Knochenproben sehr gering. Lediglich die vierte der oben genannten Fehlerquellen sollte zusätzlich berücksichtigt werden. Es ist anzunehmen, daß sich in der interstitiellen Flüssigkeit von Blutmarkproben ähnliche Konzentrationen einstellen wie in der interstitiellen Flüssigkeit von Kompakta- und Fettmarkproben.

5.5 Diskussion der Ergebnisse

Die Meßergebnisse der Blutmarkproben sind aus methodischen Gründen nicht interpretierbar. Die Meßergebnisse der Fettmarkproben liegen in der Größenordnung der Meßergebnisse der Kompaktaproben. Wegen der geringen Probenzahl ist eine Auswertung dieser Meßergebnisse nicht möglich.

In der interstitiellen Flüssigkeit von Kompaktaproben aus gesundem menschlichen Knochen werden Cefotaximkonzentrationen erreicht, die im Mittel bei 20 µg/ml liegen. Dieser Wert liegt weit über der minimalen Hemmkonzentration von Erregern, die bei der bakteriologischen Resistenzbestimmung als cefotaximsensibel beurteilt werden.
Dennoch dürfen aus diesen günstigen Meßergebnissen in gesunden Knochenproben keine Therapieempfehlungen für die Osteomyelitistherapie hergeleitet werden. Es kann nicht erwartet werden, daß die in gesundem Knochen gemessenen Cefotaximkonzentrationen auch in entzündlich verändertem Knochengewebe erreichbar sind. Durch entzündliche und infiltrative Veränderungen des Gewebes kann es zur Verschlechterung der Mikrozirkulation bis hin zur Ischämie kommen (10).

6. Zusammenfassung

Bis heute werden "Antibiotikaspiegel im Knochen" dadurch bestimmt, daß die Wirkstoffkonzentration im einfachen Knochenhomogenat gemessen wird. Dabei werden der Blutanteil in der Knochenprobe und das Gewicht der wirkstofffreien Knochenhartsubstanz nicht berücksichtigt.
Nur wenige Untersucher haben in den letzten Jahren durch Messung der Hämoglobinkonzentration oder der Konzentration von Immunglobulin M im Homogenat den Blutanteil in der Knochenprobe berücksichtigt.
In dieser Studie wird zusätzlich zum ersten Mal auch das Gewicht der Hartsubstanz in die Auswertung der gemessenen Antibiotikumkonzentrationen einbezogen. Damit wird eine weitere Näherung an den tatsächlichen Wert der Antibiotikumkonzentration in der interstitiellen Flüssigkeit des Knochens, speziell bei Kompaktaproben, erreicht. Die Antibiotikumkonzentrationen in der gesunden Kompakta liegen im Mittel bei ca. 25% der entsprechenden Serumkonzentrationen und damit recht hoch. Es wurden allerdings nur Proben aus nichtinfiziertem Knochen untersucht.
In einer pathohistologischen Analyse wird dargestellt, daß bei Osteomyelitis die Penetration des Antibiotikums in die interstitielle Flüssigkeit des Knochens infolge der entzündlichen Reaktionen stark behindert sein kann. Aus diesen Ergebnissen, die an gesunden Knochenproben gewonnen wurden, dürfen keine direkten Empfehlungen für die Chemotherapie der Osteomyelitis hergeleitet werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Könn, G., E. Böhm: Pathologische Anatomie. In: Plaue, R. (ed.): Die Behandlung der sekundär-chronischen Osteomyelitis. Enke, Stuttgart (1974)

2. Naumann, P.: Antibiotikaprophylaxe in der Traumatologie. Unfallheilkunde 82, 270 - 274 (1979)

3. Demmler, K.: Das Gefäßsystem des Knochenmarks. Enke, Stuttgart (1976)

4. Weiss, L.: An Electron Microscopic Study of the Vascular Sinuses of the Bone Marrow of the Rabbit. Bull. Johns Hopkins Hosp. 108, 171 - 199 (1961)

5. Majno, G.: Ultrastructure of the Vascular Membrane. In: Handbook of Physiology, Sect. II, Vol. 3 W.F. Hamilton, Ph. Dow (eds.) Washington D.C.: Amer. Physiol. Soc. 2293 - 2375 (1965)

6. Zamboni, L., D.C. Pease: The Vascular Bed of Red Bone Marrow. J. Ultrastr. Res. 5, 65 - 85 (1961)

7. Fuchs, U.: Morphologische Reaktionsmuster der terminalen Strombahn. In: Meessen, H. (ed.): Handbuch der allgemeinen Pathologie, Vol. III/7. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 477 - 632 (1977)

8. Burkhardt, R.: Farbatlas der klinischen Histopathologie von Knochenmark und Knochen. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1970)

9. Denne, B.: Der Feinbau der Perivaskularräume im Knochen: Untersuchungen am Modiolus cochleae. Diss. Frankfurt am Main (1974)

10. Waldvogel, F.A., G. Medoff, M.N. Swartz: Osteomyelitis. Charles C. Thomas, Springfield (1971)

11. Könn, G., B. Postberg: Zur Abgrenzung der posttraumatischen Osteomyelitis gegenüber anderen Knocheninfektionen vom Standpunkt des Pathologen. In: Hierholzer, G., J. Rehn (eds.): Die posttraumatische Osteomyelitis. Schattauer, Stuttgart-New York 3 - 10 (1970)

12. Popkirov, S.: Die Behandlung der hämatogenen und der traumatischen Osteomyelitis. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1971)

13. Nade, S.: Choice of antibiotics in management of acute osteomyelitis and acute septic arthritis in children. Archives of Disease in Childhood 52, 679 - 682 (1977)

14. Juch, E.: Behandlung der akuten Osteomyelitis. Untersuchungen über den Penicillinspiegel im Knochenmark. Langenbecks Arch. klin. Chir. 274, 107 - 112 (1953)

15. Grady, J.E., K.F. Stern: Penetration of Lincomycin into Bone. Antimicrob. Agents Chemother. 1965, 201 - 205 (1966)

16. Kessler, H.J., P. Naumann, J. Kempf: Lincomycin Serum and Bone Levels in the Rat. Br. J. Pharmac. Chemother. 30, 627 - 630 (1967)

17. Linzenmeier, G., P. Schäfer, H. Volk, M. Gatos: Bestimmung der Konzentration von Lincomycin in chronisch entzündetem Knochen und Weichteilgewebe des Menschen. Arzneimittelforschung 18, 204 - 207 (1968)

18. Krämer, J., H. Weuta: Untersuchungen über Serum- und Knochenspiegel nach Injektion von Oxacillin und Carbenicillin. Z. Orthop. 110, 216 - 223 (1972)

19. Vollenbruck, J.: Gentamycin- und Tetracyclinspiegel im Knochen des Menschen. Diss. Essen (1972)

20. Hierholzer, G., G. Linzenmeier, R. Kleining, G. Hörster: Vergleichende Untersuchungen über die Konzentration von Cephacetril und Cephalotin im normalen und chronisch entzündeten Knochengewebe. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 24, 1501 - 1504 (1974)

21. Krämer, J.: Antibiotika in der Knochenchirurgie. Fortschr. Med. 92, 781 - 782 (1974)

22. Plaue, R., K. Fabricius, S. Wysocki: Cephalothinspiegel-Bestimmungen an menschlichen Geweben. Chirurg 45, 274 - 278 (1974)

23. Smilack, J.D., W.H. Flittie, T.W. Williams: Bone Concentrations of Antimicrobial Agents After Parenteral Administration. Antimicrob. Agents Chemother. 9, 169 - 171 (1976)

24. Sandberg Sørensen, T., H. Colding, E. Schroeder, V. Thamdrup Rosdahl: The Penetration of Cephazolin, Erythromycin and Methicillin into Human Bone Tissue. Acta orthop. scand. 49, 549 - 553 (1978)

25. Thamdrup Rosdahl, V., T. Sandberg Sørensen, H. Colding: Determination of antibiotic concentrations in bone. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 5, 275 - 280 (1979)

26. Norden, C.W., E. Kennedy: Experimental Osteomyelitis. II. Therapeutic Trials and Measurement of Antibiotic Levels in Bone. J. Infect. Dis. 124, 565 - 571 (1971)

27. Rosin, H., A.-M. Rosin, J. Krämer: Determination of Antibiotic Levels in Human Bone: I. Gentamicin Levels in Bone. Infection 2, 3 - 6 (1974)

28. Vent, J., H. Laturnus: Bestimmung der Knochenkonzentration des neuen antibakteriellen Chemotherapeutikums Azlocillin. Arch. orthop. Unfall-Chir. 90, 259 - 263 (1977)

29. Cunha, B.A., H.R. Gossling, H.S. Pasternak, C.H. Nightingale, R. Quintiliani: The Penetration Characteristics of Cefazolin, Cephalothin, and Cephradine into Bone in Patients undergoing Total Hip Replacement. J. Bone Joint Surg. 59, 856 - 859 (1977)

30. Plaue, R., K. Fabricius, W. Bardens: Untersuchungen über die Verteilung von Thienylcarbenicillin in menschlichen Geweben. Chirurg 47, 331 - 335 (1976)

31. Plaue, R., O. Müller, K. Fabricius, R.O. Bethke: Untersuchungen über die Diffusionsrate von Cefamandol in verschiedene menschliche Gewebe. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 28, 2343 - 2349 (1978)

32. Rosin, H., P. Naumann: Vortrag beim Internationalen Symposion "Posttraumatische Osteomyelitis", Duisburg 7. - 8. April 1978

33. Richterich, R.: Klinische Chemie. Theorie und Praxis. S. Karger, Basel-München-Paris-London-New York-Sydney (1971)

34. Rosin, H., H.-J. Hagedorn, M. Köhler, L. Thomas: Agardiffusionsmethode. Rundtischgespräch über Methoden und Indikationen für Blutspiegelbestimmungen von Aminoglykosiden. Infection 5, 51 - 54 (1977)

35. Ho, J., P. Aswapokee, K.P. Fu, C. Matthijssen, H.C. Neu: Pharmacokinetic Parameters of Cefotaxime Following Intravenous and Intramuscular Administration - Singly and as Multiple Doses. 11th International Congress of Chemotherapy, Boston, Massachusetts (1979)

36. Thorell, B.: Ultraviolet - Microspectrophotometry in Hematology. In: Merker, H. (ed.): Zyto- und Histochemie in der Hämatologie. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 22-31 (1963)

37. Kaboth, W.: In: Begemann, H. (ed.): Klinische Hämatologie. Thieme, Stuttgart 1 - 71 (1975)

38. Mohr, R.: Über Funktionen von B- und T-Zellen. In: Theml, H., H. Begemann (eds.): Lymphozyt und klinische Immunologie. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 27 - 40 (1975)

39. Begemann, H.: In: Begemann, H. (ed.): Klinische Hämatologie. Thieme, Stuttgart 109 - 151 (1975)

40. Walter, A.M., L. Heilmeyer: Antibiotika - Fibel. Thieme, Stuttgart (1969)

41. Kofler, L.: Die Saponine. Julius Springer, Wien (1927)

Lebenslauf

Am 9. Juni 1954 wurde ich, Wolfgang Uphaus, als Sohn des Schlossers Heinrich Uphaus und seiner Ehefrau Herta Uphaus, geb. Beer, in Dortmund geboren.
Von 1960 bis 1961 besuchte ich die Steinhammerschule in Dortmund - Marten und von 1961 bis 1964 die Volksschule in Dortmund - Rahm.
1964 wechselte ich zum Helmholtz - Gymnasium in Dortmund, an dem ich im Mai 1972 meine Reifeprüfung ablegte.
Von 1972 bis 1974 leistete ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr.
Im Oktober 1974 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf und bestand dort am 20. Oktober 1980 die Ärztliche Prüfung.
Am 13. November 1980 wurde mir vom Regierungspräsidenten Düsseldorf die Approbation als Arzt erteilt.
Seit dem 29. Juli 1975 bin ich mit Christa Uphaus, geb. Kebekus, verheiratet.

gez. Wolfgang Uphaus